



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM
ALIMENTOS PARA ANIMAIS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

NAIELLY COELHO DE SOUZA

Florianópolis
Junho/2017

Naielly Coelho de Souza

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM
ALIMENTOS PARA ANIMAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Coorientador: Dr. Heitor Daguer

Florianópolis
Junho/2017

Naielly Coelho de Souza

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM
ALIMENTOS PARA ANIMAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Prof. Dr. Luciano Vitali
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
Orientador

Profa. Dra. Tatiane de Andrade Maranhão

Dr. Josias Merib

Florianópolis
Junho/2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Jeferson e Eliane, responsáveis não só por esta, mas por todas as minhas conquistas. Minha irmã, Manuella, por todo carinho e compreensão ao longo dessa jornada.

Meu namorado, João Pedro, por ter se mostrado presente ao longo desses anos, inclusive no desenvolvimento deste trabalho, e todo apoio e incentivo prestados nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos do SLAV Romalino, Juceli, Rogério, Paulo, Simone, Jacson, Marcelo e Leandro que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, não só compartilhando seus conhecimentos como em momentos de descontração. Em especial ao Heitor e Andressa por terem me dado a oportunidade de fazer parte desta equipe. E por fim, mas não menos importante, ao Luciano, por ter me ajudado ao longo deste trabalho e compartilhado um pouco do seu vasto conhecimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Gustavo Micke por toda confiança e suporte na realização deste trabalho.

E a Universidade Federal de Santa Catarina por fornecer suporte para minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Medicamentos veterinários	13
2.1.1. Antibiótico promotor de crescimento	13
2.1.2 Zilpaterol	15
2.2 Melamina	16
2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência	17
2.3.1 Cromatografia líquida por par iônico	18
2.3.2 Cromatografia com interação hidrofílica	20
2.4 Detecção por espectrometria de massas	21
2.5 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas LC-MS	23
2.6 Validação de métodos analíticos	24
2.6.1 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Solventes e Padrões	28
4.2 Preparo de amostras	28
4.3 Instrumentação	29
4.3.1 Espectrometria de massas	29
4.3.2 Cromatografia líquida	30
4.4 Desempenho do método	30
4.4.1 Linearidade	30
4.4.2 Efeito de Matriz	31
4.4.3 Seletividade/Especificidade	31
4.4.4 Precisão/exatidão	31
4.4.5 Limites analíticos	32
4.4.6 Estabilidade	33
4.5 Aplicabilidade do método	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Método de extração	34
5.2 Espectrometria de Massas	34
5.3 Cromatografia líquida	36

5.4 Desempenho do método.....	38
5.4.1 Linearidade/Efeito de matriz	38
5.4.2 Seletividade/ Especificidade	40
5.4.3 Recuperação/exatidão	41
5.4.5 Estabilidade.....	43
5.5 Aplicabilidade do método.....	43
5.6 Cromatografia por interação hidrofílica (HILIC)	45
5.7 Comparação cromatografia por par iônico e interação hidrofílica	47
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da espectinomicina.	14
Figura 2: Estruturas químicas que compõem o halquinol.	15
Figura 3: Estrutura química do zilpaterol.	15
Figura 4: Estrutura química da melamina.	16
Figura 5: Esquema de um cromatógrafo líquido.	18
Figura 6: Esquema de separação por cromatografia por par iônico.	19
Figura 7: Estrutura química do ácido heptafluorobutírico.	19
Figura 8: Mecanismo de separação proposto. ⁴²	20
Figura 9: Esquema de um espectrômetro de massas.	21
Figura 10: Esquema de uma fonte de ionização por ESI.	22
Figura 11: Esquema interno de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Ion Trap. ..	23
Figura 12: Cromatograma obtido a partir das condições cromatográficas utilizadas.	37
Figura 13: Curvas de calibração em solvente e matriz para cada analito.	39
Figura 14: Cromatogramas do primeiro e segundo ponto da curva de calibração a partir da análise de espectinomicina.	41
Figura 15: Cromatograma obtido a partir das condições cromatográficas otimizadas para a coluna HILIC.	46
Figura 16: Comparação dos cromatogramas obtidos.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros analíticos e suas respectivas definições. ^{50,51}	25
Tabela 2: Níveis de fortificação para avaliação de precisão e recuperação.....	32
Tabela 3: Categorias das amostras analisadas.	33
Tabela 4: Fragmentos monitorados.....	35
Tabela 5: Parâmetros do espectrômetro de massas otimizados.....	35
Tabela 6: Gradiente de eluição.	36
Tabela 7: Condições cromatográficas otimizadas e tempos de retenção dos analitos.	37
Tabela 8: Resultados obtidos das curvas de calibração construídas em matriz.	38
Tabela 9: Valores obtidos a partir do cálculo do efeito de matriz.	40
Tabela 10: Resultados de recuperação e precisão.	41
Tabela 11: Limites analíticos.	42
Tabela 12: Resultados obtidos através das amostras fiscais analisadas.	44
Tabela 13: Parâmetros cromatográficos.....	45
Tabela 14: Tempos de retenção dos analitos em estudo.	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

CC α : Limite de decisão

CC β : Capacidade de detecção

HILIC: Cromatografia por interação hidrofílica

HFBA: ácido heptafluorobutírico

DP: diferença de potencial de entrada na fonte

CE: energia de colisão

EP: Potencial de entrada

CXP: Potencial de saída da célula de colisão

LOD: limite de detecção

LOQ: limite de quantificação

CV: coeficiente de variação

REC: recuperação

RESUMO

Um método para determinação de medicamentos veterinários em alimentos para animais por cromatografia líquida utilizando pareador iônico acoplada à espectrometria de massas foi desenvolvido e validado de acordo com os protocolos de validação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Decisão 657/2002 da União Europeia. Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, recuperação, estabilidade, limites de detecção e quantificação, limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). Baixos desvios de precisão e limites analíticos foram obtidos, conferindo confiabilidade e sensibilidade ao método desenvolvido. A aplicabilidade foi avaliada a partir da análise de 20 amostras de rações para bovinos, rações para suínos, rações para aves, produtos de origem animal e vegetal e suplementos minerais. Algumas amostras apresentaram concentrações quantificáveis de halquinol e zilpaterol, reforçando a importância deste método analítico no controle desses medicamentos. A partir desse estudo também pode-se observar que o método não se mostrou adequado para análises de suplementos minerais, sendo necessária outra abordagem de calibração para estas matrizes, como por exemplo, calibração por adição de padrão. Em paralelo, para fins comparativos, a cromatografia baseada na interação hidrofílica (HILIC) foi testada para separação dos analitos, apresentando menor eficiência de separação e maior tempo de análise, custo e volume de resíduos gerados em relação à separação cromatográfica utilizando par iônico.

Palavras-chave: medicamentos veterinários, validação, pareador iônico, HILIC.

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos tem havido um crescimento notável na utilização de medicamentos veterinários para animais, tanto para fins terapêuticos e profiláticos, como na função de promotores de crescimento, visando um maior desempenho produtivo, impulsionado pelo aumento do consumo mundial de produtos animais. Os medicamentos podem ser administrados aos animais por diferentes vias, como intramuscular, subcutânea e pelos alimentos (via oral), sendo esta última amplamente utilizada devido à sua praticidade. Contudo, a utilização inadequada de medicamentos em alimentos para animais pode resultar na presença de resíduos nos produtos de origem animal destinados ao consumo humano, (tecidos, ovos e leite), podendo causar prejuízos à saúde dos consumidores. Dentre os danos causados estão: manifestações alérgicas, efeitos mutagênicos, efeitos carcinogênicos, efeitos nefrotóxicos, desordens reprodutivas, desenvolvimento de micro-organismos resistentes aos antibióticos usados em terapia humana, entre outros.^{1,2,3}

Diante desse quadro, o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal é de extrema importância, e visa principalmente a proteção do consumidor, evitando sua ingestão indireta através dos alimentos. Por outro lado, o controle nos alimentos para animais também se faz necessário, já que torna possível rastrear toda a cadeia produtiva. Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e específicos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários na alimentação animal.⁴

Nesse contexto, este trabalho buscou desenvolver e validar um método capaz de quantificar os medicamentos veterinários espectinomicina, halquinol, zilpaterol e o adulterante melamina presentes em alimentos para animais por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Além disso, foram comparadas duas técnicas cromatográficas, cromatografia por par iônico e interação hidrofílica, com o objetivo de avaliar eficiência de separação dos analitos, custo e tempo de análise e quantidade de resíduos gerados.

É importante ressaltar que o presente trabalho é uma extensão de um método já desenvolvido e validado pelo grupo de pesquisa onde este trabalho foi desenvolvido, para controle de medicamentos veterinários, apolares, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.⁵

O trabalho foi realizado, na Seção Laboratorial Avançada (SLAV), unidade avançada do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS), pertencente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizada no município de São José, Estado de Santa Catarina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Medicamentos veterinários

Medicamentos veterinários são substâncias químicas aplicadas ou administradas aos animais visando à prevenção ou o tratamento de doenças além de, atuar como modificadores de funções fisiológicas, comportamentais ou promotores de crescimento. A utilização destas substâncias tem como objetivo aumentar o potencial produtivo dos animais destinados à produção de alimentos para consumo humano.⁶

Dentre os medicamentos ministrados aos animais, destacam-se a espectinomicina e o halquinol (antibióticos promotores de crescimento) e o zilpaterol (promotor de crescimento), os quais serão avaliados neste trabalho.

2.1.1. Antibiótico promotor de crescimento

Antibiótico promotor de crescimento foi definido por Peter Hughes e John Heritage⁷, como sendo qualquer medicamento que destrói ou inibe a multiplicação de bactérias, que são administrados com uma dose subterapêutica.

Os efeitos dos antibióticos promotores de crescimento foram descobertos na década de 40 quando ministrados a frangos. Foram observados que os frangos submetidos a estes medicamentos em sua alimentação exibiram taxas de crescimento maiores quando comparados a frangos que não foram submetidos a essa alimentação.⁸ A partir de então, o uso e a variedade destes medicamentos vem expandindo e sendo aplicado a rações de diferentes espécies devido a intensificação da pecuária e da procura dos consumidores.⁹

2.1.1.1 Espectinomicina

A espectinomicina (Figura 1) é um antibiótico pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos, que são amplamente utilizados no combate a bactérias e parasitas e como promotor de crescimento.¹⁰

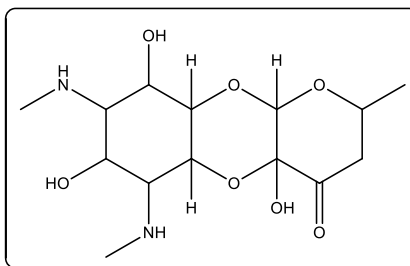


Figura 1: Estrutura química da espectinomicina.

Este medicamento é ministrado a aves e suínos, acumulando-se nos seus tecidos. O consumo dos tecidos contaminados é prejudicial à saúde humana devido à sua toxicidade, desenvolvimento de processos alérgicos e por provocar resistência aos antibióticos utilizados em terapia humana.¹⁰ Apesar dos problemas associados à sua utilização em alimentos para animais, não a legislação vigente para controle deste medicamento.

Farouk *et al.* (2015)¹¹ relatam a dificuldade de análise de antibióticos pertencentes a esse grupo, devido à ausência de grupos cromóforos em sua estrutura e elevada polaridade, o que dificulta a análise por cromatografia em fase reversa e detecção espectrofotométrica UV. Como consequência, diversos grupos de pesquisa vêm trabalhando na separação e detecção desse grupo de antibióticos por cromatografia líquida utilizando fase estacionária reversa e pareador iônico ou por interação hidrofílica, ambas acopladas à espectrometria de massas.^{10,11,12,13,14}

2.1.1.2 Halquinol

O halquinol, mistura controlada do 5,7-dicloro-8-quinolinol, 5-cloro-8-quinolinol e 7-cloro-8-quinolinol (Figura 2), é um antimicrobiano utilizado como promotor de crescimento que apresenta um alto nível de atividade contra uma variedade de bactérias e parasitas.¹⁵

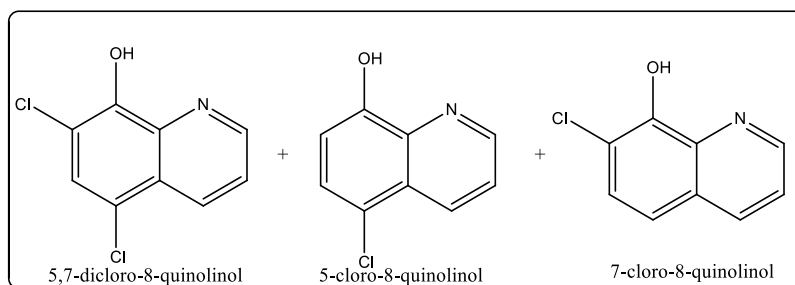


Figura 2: Estruturas químicas que compõem o halquinol.

Este medicamento é ministrado a suínos e aves, acumulando-se nos seus tecidos. O consumo dos tecidos contaminados é prejudicial por promover resistência aos fármacos ministrados em terapia humana, ocasionando assim o aparecimento de novas superbactérias.¹⁵ Apesar dos problemas associados à sua utilização em alimentos para animais, não a legislação vigente para controle deste medicamento.

Apesar da importância na determinação deste medicamento veterinário, uma quantidade relativamente pequena de trabalhos são encontrados na literatura para seu monitoramento. Os trabalhos encontrados baseiam-se na determinação de halquinol por diversas técnicas como cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).^{16,17,18}

2.1.2 Zilpaterol

O zilpaterol (Figura 3) é um medicamento veterinário pertencente ao grupo dos β -agonistas que atua reduzindo o teor de gordura presente na carcaça do animal e aumentando sua massa muscular, consequentemente promovendo o crescimento animal, conforme efeitos já descritos por Estrada-Angulo *et al.* (2008)¹⁹, Macías-Cruz *et al.* (2010)²⁰, Avendano-Reyes *et al.* (2011)²¹ e López-Carlos *et al.* (2014)²².

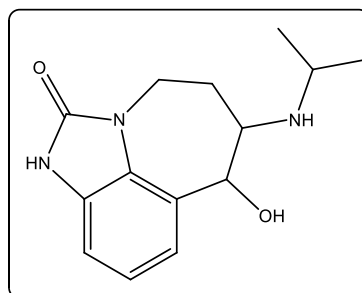


Figura 3: Estrutura química do zilpaterol.

Este medicamento pode ser administrado a suínos e ruminantes, sendo propenso a acumular-se nos tecidos animais. Efeitos negativos envolvendo o uso desse medicamento sobre o comportamento e o bem-estar animal como, aumento da temperatura corporal e taxa de respiração, foram relatados por Hales *et al.* (2014)²³ e Boyd *et al.* (2015)²⁴, além de problemas de saúde pública devido a carne de bovinos de corte suplementados.^{25,26}

Como consequência, foram encontrados na literatura diversos métodos para determinação de zilpaterol, variando a técnica de determinação e matrizes como: fígado, músculo, vísceras, urina, fluidos corporais e alimentos para animais.^{27,28,29} Apesar dos problemas associados à sua utilização em alimentos para animais, não a legislação vigente para controle deste medicamento.

2.2 Melamina

A melamina é um produto químico industrial utilizado na produção de resinas de melamina-formaldeído. É utilizada também, como adulterante de alimentos, com o objetivo de aumentar o teor aparente de proteína bruta devido à alta quantidade de nitrogênio presente em sua estrutura (Figura 4).³⁰

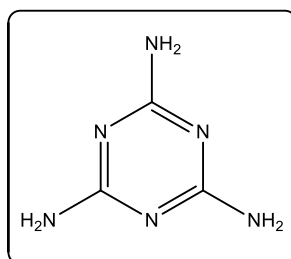


Figura 4: Estrutura química da melamina.

A ingestão de altas concentrações de melamina pode induzir a lesões renais sérias nos animais e seres humanos, uma vez que ao combinar-se com ácido cianúrico cristais de melamina cianureto, insolúveis nos rins, são formados. Esse processo pode causar insuficiência renal e levar a morte dos indivíduos.^{31,32}

Como consequência, foi estabelecido um nível máximo permitido de resíduo de melanina em 1,0 mg kg⁻¹ para produtos alimentícios infantis em pó e 2,5 mg kg⁻¹

para outros alimentos e rações para animais, tornando necessário que haja métodos analíticos sensíveis para seu controle.^{33,34}

Embora muitos métodos venham sendo publicados, os métodos baseados na detecção por espectrometria de massas vêm se destacando, devido a sua alta seletividade e poder de alcançar baixos limites analíticos (Chen *et al.* (2015)³⁵, Tkachenko *et al.* (2015)³⁶ e Su *et al.* (2012)³⁷.

2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência emprega colunas recheadas com partículas finamente divididas (fase estacionária) e uma fase móvel líquida eluída sob alta pressão. É uma das técnicas mais utilizadas para a separação de compostos, uma vez que consegue promover separações de misturas que contêm um grande número de compostos similares. Além disso, promove análises quantitativas em um curto período de tempo, com alta resolução, eficiência e detectabilidade.³⁸

A separação ocorre por estágios de equilíbrio entre o analito, a fase estacionária e a fase móvel. Com o início da corrida cromatográfica, o solvente é impulsionado por uma bomba de alta pressão em direção à coluna. Simultaneamente, a amostra é introduzida na fase móvel por uma válvula de introdução de amostra e arrastada para a coluna, onde ocorre o processo de separação. O efluente da coluna é direcionado para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos. O sinal gerado pelo detector é capturado por um software apropriado e um cromatograma é gerado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de retenção dos analitos, como ilustrado na Figura 5.³⁹

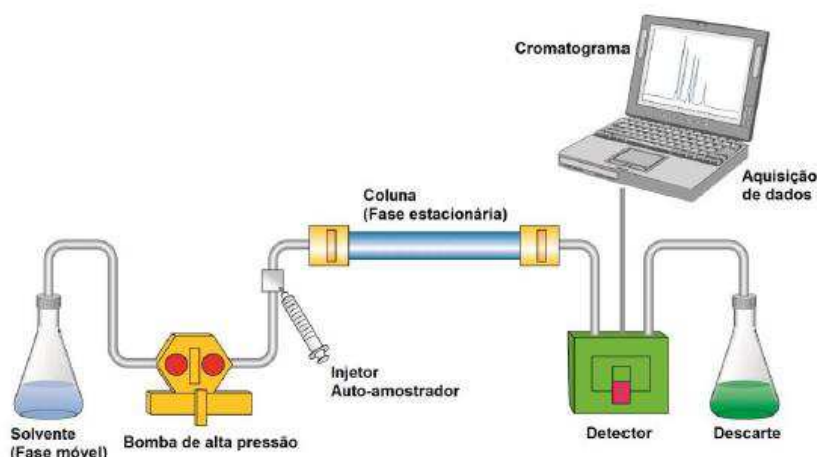


Figura 5: Esquema de um cromatógrafo líquido.

O tipo de cromatografia líquida é geralmente definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fases estacionária e móvel, incluindo cromatografia por partição, adsorção, troca iônica, exclusão, por afinidade e quiral.⁴⁰ Fases estacionárias comumente utilizadas são as fases normal e reversa.

Fases estacionárias normais são constituídas por grupos polares e utilizam solventes menos polares como fase móvel. Desse modo, este mecanismo é ideal para separação de misturas contendo analitos polares, uma vez que terão maior interação com a fase estacionária do que com a fase móvel. Já fases estacionárias reversas são constituídas por grupos apolares e utilizam fases móveis menos apolares, ideais para separação de analitos com características mais apolares.

2.3.1 Cromatografia líquida por par iônico

A cromatografia por par iônico é uma versão de alto desempenho da cromatografia por troca iônica. Essa técnica é aplicada na separação de amostras iônicas utilizando uma fase estacionária reversa. Neste mecanismo de separação, o pH da fase móvel é ajustado de modo a promover a ionização dos componentes da amostra. Adiciona-se o reagente par iônico, normalmente surfactantes com cargas opostas aos analitos a serem separados, para formação de um par iônico de carga neutra entre o analito e o surfactante. O par iônico neutro ao entrar em contato com a fase estacionária reversa, fica adsorvido devido à interação que ocorre entre a fase estacionária (apolar) e a cauda alifática presente no surfactante, como ilustrado na Figura 6, proporcionando a separação.⁴⁰

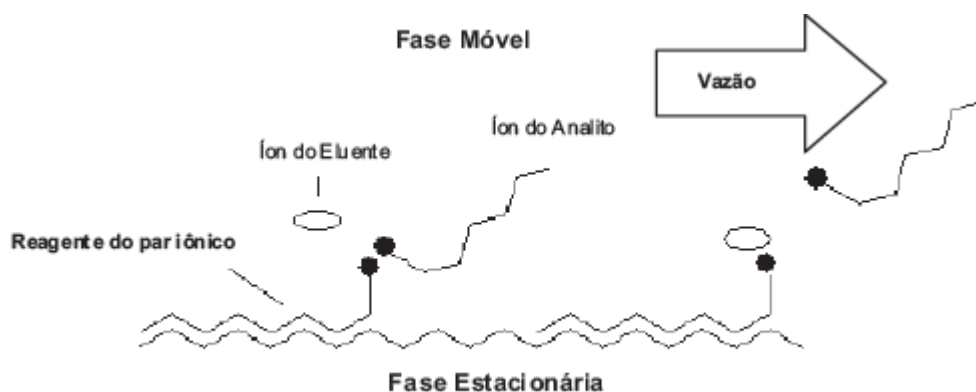


Figura 6: Esquema de separação por cromatografia por par iônico.

A cromatografia de par iônico é mais complexa que a cromatografia em fase reversa, pois o equilíbrio entre o surfactante e a fase estacionária é lento, a separação é mais sensível às variações de temperatura e de pH.³⁹

Como exemplos de reagente par-iônico podem ser citados: ácido heptafluorobutírico (HFBA), ácido tridecafluorohelptanóico (TDFHA), ácido perfluoropentanóico (NPFA), entre outros.

O HFBA é um ácido carboxílico fluorado (Figura 7), muito utilizado como pareador iônico por promover a separação de analitos polares utilizando fase estacionária reversa e permitir detecção por espectrometria de massas por ser suficientemente volátil.⁴¹

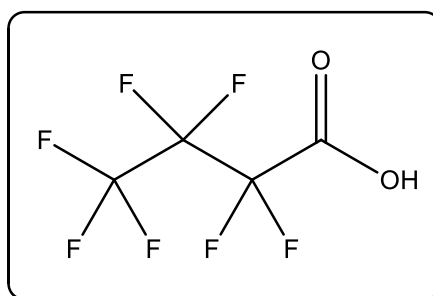


Figura 7: Estrutura química do ácido heptafluorobutírico.

Embora não seja abordado na literatura o modo com que este pareador iônico promove a separação em fase reversa, acredita-se que a parte hidrofóbica presente em sua estrutura interage com a fase estacionária, enquanto o íon carboxilato fica responsável por interagir com os analitos a serem separados.

2.3.2 Cromatografia com interação hidrofílica

A cromatografia com interação hidrofílica (HILIC) é uma forma de cromatografia líquida de alta eficiência utilizada na separação de compostos polares empregando fases estacionárias polares tradicionais (tais como sílica, amino ou ciano) e uma mistura de solvente orgânico (normalmente acetonitrila), solução tampão e água como fase móvel.⁴²

As primeiras aplicações do HILIC foram inicialmente voltadas à análise de compostos orgânicos biológicos como carboidratos, aminoácidos e peptídeos. Recentemente, esse campo de aplicações tem crescido muito, uma vez que muitos fármacos e medicamentos veterinários, compostos de elevada polaridade, vem sendo analisados por esta técnica, especialmente quando presentes em baixas concentrações.⁴³

O mecanismo de separação do modo HILIC foi por muito tempo comparado ao modo normal de eluição. No entanto, estudos recentes mostram que a separação por meio do modo HILIC é muito mais complexa.⁴² O mecanismo de retenção envolvendo interação hidrofílica é proposto como uma partição do analito entre o eluente e uma camada rica em água, parcialmente mobilizada na fase estacionária, como pode ser observado na Figura 8.⁴³

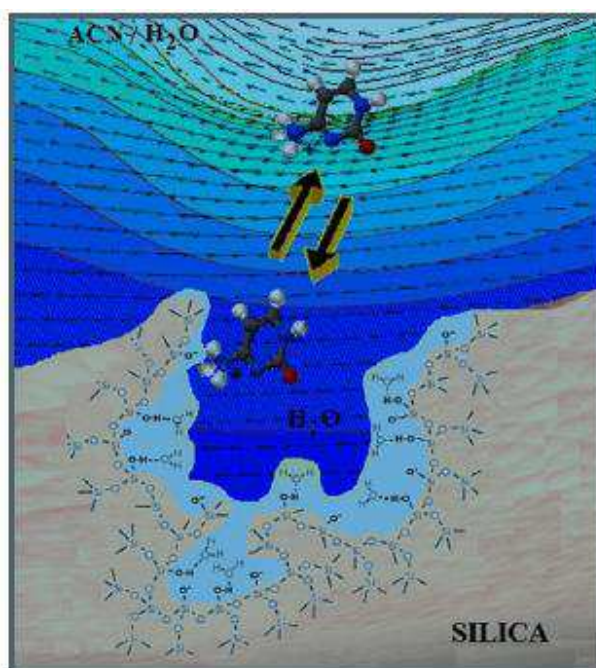


Figura 8: Mecanismo de separação proposto.⁴²

2.4 Detecção por espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica de alto poder analítico utilizada para identificar e quantificar compostos conhecidos e desconhecidos presentes em uma amostra, além de elucidar a estrutura e propriedades químicas com alta sensibilidade e seletividade. O processo completo consiste na conversão da amostra em íons gasosos, que são em seguida, caracterizados por sua razão massa/carga (m/z).^{39,40}

Um espectrômetro de massas consiste em um instrumento composto por uma unidade de entrada de amostra, uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de dados, representado na Figura 9.

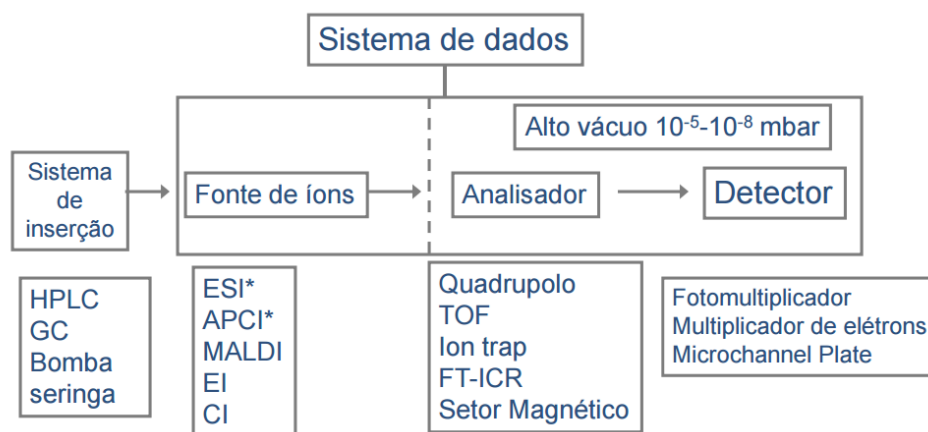


Figura 9: Esquema de um espectrômetro de massas.

O primeiro componente é a unidade de entrada de amostra, responsável por introduzir a amostra no espectrômetro e transportá-la até a fonte de íons, onde as moléculas presentes na amostra são transformadas em íons em fase gasosa. Após a sua formação, os íons são acelerados por um campo magnético até o analisador de massas, onde ocorrerá a separação dos íons, baseada na sua razão massa/carga (m/z). Os íons chegam até o detector, cuja função é amplificar o sinal pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que são armazenados e traduzidos em imagens por um sistema de dados.³⁸

Em geral, os espectrômetros de massas podem ser diferenciados entre si pelo tipo de fonte de íons (ionização por elétrons, ionização química, por dessorção, e *electrospray*) e pelo analisador de massas (quadrupolo (Q), aprisionador de íons

(IT) e tempo de voo (TOF)). Cada fonte e analisador de massas possui características específicas, que devem ser levadas em consideração durante a aquisição do equipamento.^{38,40}

A fonte de ionização mais utilizada e estudada é a de *electrospray* (Figura 10) por possuir aplicabilidade a uma grande faixa de compostos. Basicamente, analitos dissolvidos em solventes miscíveis em água (acetonitrila e/ou metanol) são ionizados quando atravessam um capilar metálico aplicado de voltagem. Um fluxo de gás inerte coaxialmente a solução é aplicado, diminuindo as gotas previamente formadas gerando um *spray*. Esse método de ionização permite a formação de íons positivos ou negativos, de acordo com a seletividade da molécula no ensaio.^{44,45} É ideal para compostos polares, iônicos e de alto peso molecular, como peptídeos e proteínas.⁴⁶

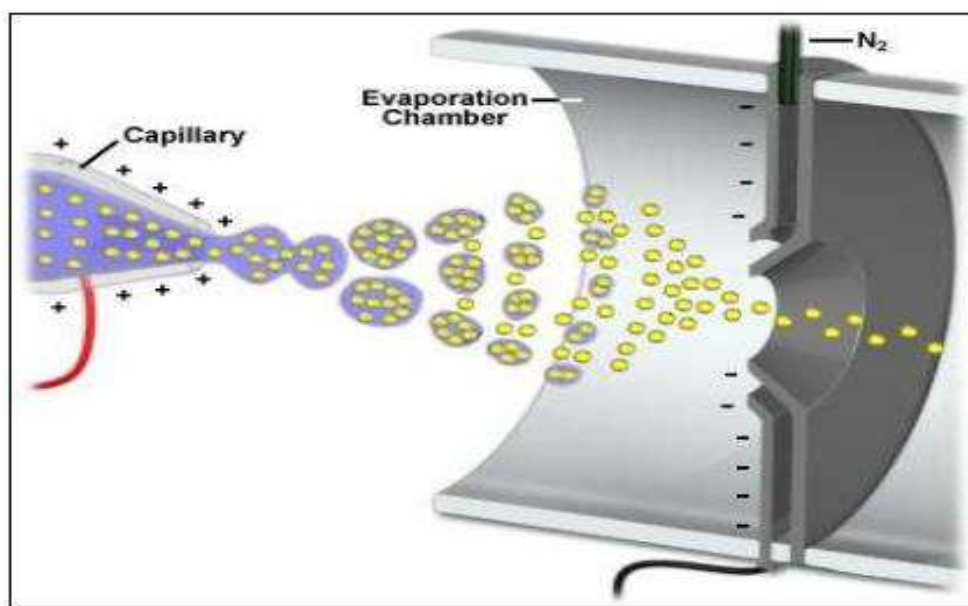


Figura 10: Esquema de uma fonte de ionização por ESI.

Dentre os analisadores de massas existentes, os mais populares são o aprisionador de íons, tempo de voo (TOF) e o quadrupolo (Q). O mais utilizado é o quadrupolo sendo composto por quatro barras sólidas paralelas na direção do feixe de íons. Este analisador é considerado robusto e costuma ser empregado em análises qualitativas e quantitativas. Estão disponíveis também, equipamentos que contém dois ou mais analisadores de massa de forma sequencial, chamados de MS/MS ou em modo *tandem*, onde o íon focalizado por aprisionamento (Q0) é selecionado no primeiro quadrupolo como íon precursor (Q1), analisado e em

seguida fragmentado na câmara de colisão (Q2), para posterior análise dos íons de segunda geração no terceiro quadrupolo (Q3), esquema presente na Figura 11. Analisadores sequenciais são empregados quando a fragmentação de íons passa a ser desejada, conferindo maior seletividade a técnica uma vez que, a possibilidade da seleção de apenas um íon a ser analisado, excluindo todos os demais íons gerados no processo de ionização, reduz o ruído do sistema.^{39,40,47}

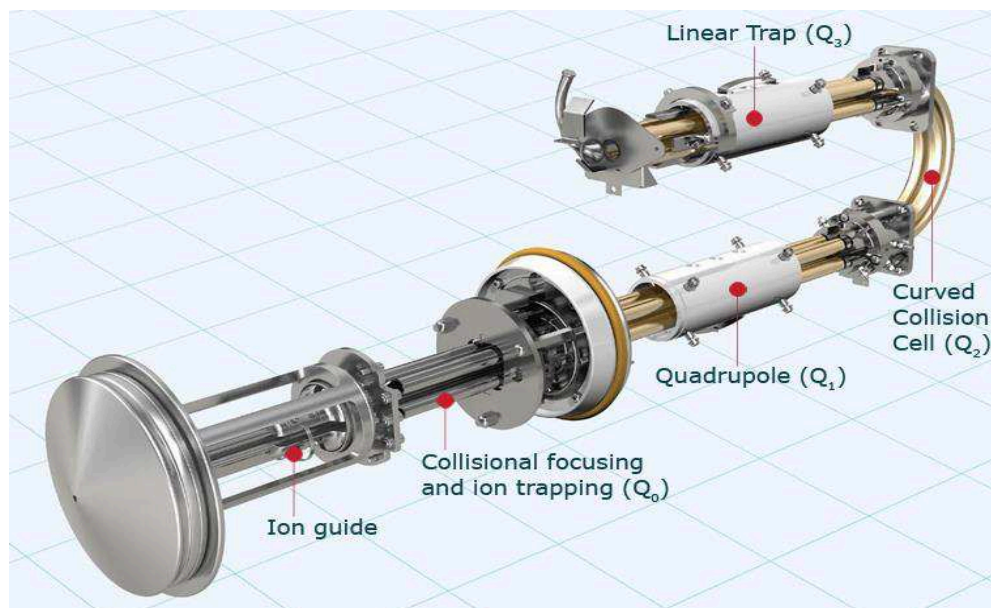


Figura 11: Esquema interno de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Ion Trap.

2.5 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas LC-MS

A combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas pode ser vista como a fusão ideal entre a separação e a detecção, uma vez que o espectrômetro de massas pode identificar com detectabilidade as espécies à medida que elas são eluídas da coluna.³⁹

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas apresenta diversas vantagens como: alta seletividade e sensibilidade, boa detectabilidade e possibilidade de detecção de diferentes analitos em baixas concentrações de forma simultânea, a partir da informação de suas massas molares.⁴⁸

2.6 Validação de métodos analíticos

Após o desenvolvimento de um método analítico e antes de sua implementação em rotina laboratorial, o mesmo deve ser submetido a um processo de validação analítica.³⁹ De acordo com o documento da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) 'ABNT NBR ISO/IEC 17025', validação analítica é a confirmação por exame e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Para certificação de um laboratório nesta norma, o mesmo precisa se preocupar com todos os processos de testes e/ou calibragem, desde a gestão e definições até os processos técnicos, uma vez que se trata de uma instituição que precisa de resultados precisos e fiéis aos experimentos, de modo que o certificado comprova que o laboratório executa suas atividades com precisão e com resultados de qualidade.⁴⁹

A validação analítica permite garantir a qualidade dos resultados de um determinado método nas condições em que será utilizado rotineiramente, para isso são estabelecidos os chamados parâmetros de validação.⁵⁰ Para validação de métodos que envolvem resíduos de medicamentos veterinários em alimentos para animais os principais protocolos adotados são do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Decisão 657/2002 da União Europeia.^{51,52}

Os parâmetros analíticos validados de acordo com estes protocolos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros analíticos e suas respectivas definições.^{51,52}

Parâmetro	Definição
Seletividade	Capacidade que o método possui de distinguir o analito em compostos endógenos e exógenos a matriz.
Linearidade	Capacidade de o método obter resultados diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma dada amostra, dentro de um intervalo especificado.
Efeito de matriz	Detectar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz.
Precisão	Concordância entre resultados independentes sob determinadas condições de medição dada a uma mesma amostra.
Estabilidade	Estabilidade dos analitos nas condições que o laboratório submete as amostras e os padrões.
Limite de detecção	Menor concentração do analito na amostra que produz um sinal que pode ser distinguido do sinal do branco, dentro de um critério estatístico.
Limite de quantificação	Menor concentração do analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis.
Exatidão	Grau de concordância entre o valor médio de uma série de resultados de ensaio e um valor de referência (considerado convencionalmente verdadeiro).

Além dos parâmetros abordados na Tabela 1, a Decisão 2002/657/CE recomenda a determinação do limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), parâmetros que medem o desempenho do procedimento analítico e auxiliam na interpretação dos resultados.

2.6.1 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

Segundo a Decisão 657/2002/CE, o limite de decisão é o limite pelo qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α , probabilidade de uma amostra ser conforme apesar de um resultado não conforme ter sido obtido. Já a capacidade de detecção é o menor teor da substância que pode ser detectado e/ou quantificado em uma amostra com uma probabilidade de erro β ,

probabilidade da amostra analisada ser não conforme, obtendo-se um resultado conforme.⁵¹

Para determinação do $CC\alpha$ e $CC\beta$ é considerado o erro da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, o chamado nível de interesse ou limite regulatório. Esse erro compreende a variabilidade do sistema, causado por efeitos randômicos gerados por analistas e equipamentos em faixas de concentrações específicas, após exclusão de *outliers*.⁵¹

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para determinação de espectinomicina, halquinol, melamina e zilpaterol em alimentos para animais por cromatografia líquida por par iônico acoplada à espectrometria de massas.

3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar as condições de cromatografia e encontrar os parâmetros ideais no espectrômetro de massas, visando adequada separação e detecção dos analitos;
- Validar o método desenvolvido de acordo com a Decisão 657/2002/EC em termos de: seletividade, especificidade, linearidade, efeito de matriz, precisão, recuperação, estabilidade, limite de decisão, capacidade de detecção e aplicabilidade em amostras reais.
- Comparar a separação dos analitos por cromatografia líquida por par iônico e cromatografia líquida por interação hidrofílica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes e Padrões

Todos os solventes utilizados foram de grau analítico. Acetonitrila, metanol e ácido fórmico obtidos de J.T. Baker (EUA). Toda água utilizada nos ensaios foi ultrapura obtida por um sistema purificador Mega Purity (EUA). O pareador iônico utilizado na pesquisa, ácido heptafluorobutírico (HFBA), foi fornecido pela Sigma-Aldrich.

Os materiais de referência de espectinomicina e melamina foram fornecidos por Dr. Ehrenstorfer (Alemanha), halquinol foi fornecido pela Farmabase (Brasil) e zilpaterol fornecido por Toronto Research Chemicals (Canadá).

Soluções-estoque dos analitos foram preparadas separadamente em uma concentração de 1000 mg L^{-1} , utilizando diferentes solventes. Soluções de halquinol e espectinomicina foram preparadas em metanol; melamina em acetonitrila:água (50:50) e zilpaterol somente em acetonitrila. A solução de trabalho foi preparada através da diluição de cada solução-estoque em acetonitrila:água (50:50), resultando em uma concentração final de 100 mg L^{-1} . Todas as soluções foram armazenadas a -20°C .

4.2 Preparo de amostras

Todos os procedimentos de validação foram realizados com uma amostra branca composta de farelo de milho (40%), farelo de soja (18%), farelo de arroz (20%), farelo de trigo (18%), fosfato (0,5%), cloreto de sódio (0,5%) e mistura vitamínica (1%), processada pelo laboratório.

As amostras brancas foram pesadas ($1,0 \pm 0,05 \text{ g}$) em tubos de polipropileno com capacidade de 50 mL. Foram adicionados 5 mL de uma solução composta por água e ácido fórmico (1:5). Em seguida, foram agitadas vigorosamente em mesa agitadora (Thermo Fisher modelo MaxQ 3000) por 20 minutos e posteriormente centrifugadas (Thermo Fisher modelo Megafure 40R) por 20 minutos à temperatura de 4°C e 4000 rotações por minuto. Após a centrifugação, as amostras foram resfriadas em freezer por uma hora a uma temperatura de -20°C . Em sequência, as amostras foram centrifugadas novamente a 4°C e 4000 rpm por 20 minutos. Um

volume de 100 μL do extrato foi transferido para um microtubo de polipropileno e diluído 10 vezes com uma solução composta por água e acetonitrila (1:5). Os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 4 °C e 13000 rpm. Por fim, 800 μL do sobrenadante foram transferidos para vials que foram inseridos no sistema LC-MS.

4.3 Instrumentação

A cromatografia líquida foi realizada em um sistema 1290 Infinity da Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, EUA), com bomba binária, degaseificador, auto-amostrador refrigerado e aquecedor de coluna. A espectrometria de massas foi realizada com o espectrômetro triplo quadrupolo linear híbrido com armadilha de íons (5500 QTrap), fabricado pela Sciex (Framingham, MA, EUA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), trabalhando no modo positivo (ESI) e modo de monitoramento múltiplo de reações (MMR).

4.3.1 Espectrometria de massas

Para otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, cada composto foi infundido separadamente com fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ e concentrações entre 5-50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foi utilizado o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para identificação de cada analito a partir do seu número de massa, bem como identificação de duas quebras estáveis (uma transição utilizada para confirmação e outra para quantificação) e definição das melhores condições para cada parâmetro. As moléculas foram monitoradas no modo positivo, ou seja, sua massa somada a massa de um próton, por apresentarem maior sinal/resposta neste modo.

As condições do equipamento otimizadas foram a temperatura da fonte, diferença de potencial de entrada na fonte (DP), energia de colisão (CE), potencial de entrada em Q1 (EP), potencial de saída da célula de colisão (CXP) e pressão de gás nitrogênio, utilizado para nebulização e colisão. O valor escolhido para cada parâmetro foi o que apresentou maior intensidade de sinal.

4.3.2 Cromatografia líquida

Para otimização dos parâmetros cromatográficos foi utilizada uma solução composta pelos analitos em concentrações individuais de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Somente após os parâmetros terem sido otimizados, foram analisadas as amostras em estudo, com intuito de confirmar as condições determinadas.

A separação utilizando a técnica por par iônico foi realizada em uma coluna C₁₈ Venusil XBP (50 x 2,1 mm, com diâmetro de partícula de 3 μm e tamanho 100 Å), fabricada por Agela Technologies (Wilmington, DE, EUA, com uma coluna de guarda C₁₈ (4,0 mm x 3,0 mm), fabricada por Phenomenex (Torrance, CA, EUA), apesar de uma coluna de 100 x 2,1 mm, com diâmetro de partícula de 3 μm também ter sido testada. Na separação por modo HILIC foi utilizada uma coluna Thermo Hypersil GOLD HILIC (150 x 3,0 mm, com diâmetro de partícula de 5 μm).

Com relação às fases móveis, a separação envolvendo a técnica de cromatográfica por par iônico foi utilizada água como fase móvel A e acetonitrila como fase móvel B, ambas contendo 0,12% HFBA (pareador iônico). Já no modo HILIC, foram utilizadas como fases móveis A e B água e acetonitrila, respectivamente, com adição de 10 mmol L^{-1} de tampão formiato de amônio.

4.4 Desempenho do método

Os parâmetros de validação avaliados de acordo com a Decisão 2002/657/CE foram linearidade/faixa de trabalho, seletividade/especificidade, efeito de matriz, precisão/recuperação, estabilidade, limite de decisão ($\text{CC}\alpha$) e a capacidade de detecção ($\text{CC}\beta$). Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram avaliados de acordo com o MAPA (Brasil, 2011).⁵²

4.4.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir da preparação de curvas de calibração realizadas em triplicata de preparo contendo seis níveis de concentrações (incluindo zero) em diferentes dias. A curva de calibração foi construída plotando a área do pico *versus* concentração, tendo como critério de aceitação coeficiente de regressão (R^2) maior que 0,95.

4.4.2 Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi avaliado por semelhança de matriz (matriz produzida), onde foram construídas duas curvas de calibração, sendo elas: curva em solvente (realizada a partir da diluição dos padrões em solvente) e curva em matriz (fortificação da matriz branca produzida realizada antes do procedimento de extração). As inclinações das curvas lineares foram comparadas e o efeito de matriz calculado de acordo com Hoff *et al.* (2015)⁵³, onde a divisão dos valores dos coeficientes de inclinação da curva em matriz pela curva em solvente deve resultar em um valor entre 0,9 e 1,2, para que não haja efeito de matriz.

4.4.3 Seletividade/Especificidade

Amostras brancas e comerciais de diferentes composições foram analisadas a fim de avaliar a seletividade/especificidade do método. Para isso, foi analisada a presença de possíveis interferentes no tempo de retenção e transição de cada analito. As amostras foram comparadas após procedimento de fortificação.

4.4.4 Precisão/exatidão

Foram avaliadas 18 amostras fortificadas em três níveis de concentração (Tabela 2), a fim de analisar a recuperação e precisão. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e reprodutibilidade interna, considerando dois analistas e três dias de análise. Os critérios de aceitação destes parâmetros foram de acordo com o MAPA (Brasil,2011), onde coeficiente de variação deve ser inferior a 30% para reprodutibilidade interna (precisão intermediária), coeficiente de variação deve ser inferior a 20% para repetitividade, e a taxa de recuperação deve estar entre 80 e 110%.⁵²

Tabela 2: Níveis de fortificação para avaliação de precisão e recuperação.

Nível de fortificação (mg kg ⁻¹)			
Níveis de concentração	C2	C3	C4
Concentração do padrão	1,25	2,50	3,75

Onde C2, C3 e C4 são, respectivamente, a segunda, terceira e quarta concentração da curva de calibração.

A recuperação foi calculada utilizando a equação 1:

$$Rec(\%) = valor \frac{experimental}{referência} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

O coeficiente de variação foi calculado utilizando a equação 2:

$$CV(\%) = \frac{desvio\ padrão}{média} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

4.4.5 Limites analíticos

O limite de decisão (CC α) foi obtido pela multiplicação do desvio padrão das médias das fortificações durante a validação, pelo fator 1,64 (1 desvio padrão de uma distribuição normal como abrangência dos resultados) e ponderado na média geral. Já a capacidade de detecção (CC β) foi obtida pela multiplicação do desvio padrão das médias das fortificações durante a validação pelo fator 1,64 e somando o valor de CC α . Ambos calculados a partir do terceiro nível de quantificação (ponto C3 da curva de calibração).

O limite de detecção (LOD) foi determinado como sendo o primeiro sinal analítico com reprodutibilidade e o limite de quantificação (LOQ) determinado como sendo o primeiro ponto da curva de calibração.

4.4.6 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada a partir do armazenamento de extratos em triplicata a 4°C durante um período de 1, 2, 6, 10 e 15 dias, com a finalidade de avaliar a estabilidade dos analitos no extrato. Os resultados obtidos foram comparados com resultados de análises realizadas logo após o preparo da amostra. A análise de variância ao nível 5% foi realizada para determinar diferenças em variâncias das concentrações obtidas, em relação ao extrato lido no primeiro dia.

4.5 Aplicabilidade do método

Como forma de aplicar o método, foram analisadas 20 amostras fiscais de alimentos para animais de diferentes tipos. Foram analisadas: rações para bovinos, rações para aves, rações para suínos, suplementos inorgânicos, produtos de origem vegetal (arroz, trigo e sorgo) e produtos de origem animal (farinha de carne e ossos, farinha de penas e farinha de vísceras de aves) Tabela 3. Em paralelo, foram avaliadas as recuperações dos analitos nas diferentes matrizes a partir da fortificação das amostras.

Tabela 3: Categorias das amostras analisadas.

Amostras (nº)	Categoria
1,2,3 e 4	Rações para bovinos
4,5 e 6	Rações para aves
7 e 8	Rações para suínos
9,10,11,12 e 13	Suplementos premix inorgânicos
14,15,16 e 17	Produtos de origem vegetal
18,19 e 20	Produtos de origem animal

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Método de extração

Ração é uma matriz complexa que contém altas concentrações de carboidrato, proteína e gordura. Assim, deve ser realizado um procedimento de extração que minimize a extração destes interferentes presentes na matriz.

O procedimento de extração realizado foi baseado em um método já validado pelo MAPA para determinação de melamina em rações que utiliza como solução extratora água e ácido fórmico. A utilização de água acidificada com 20% de ácido fórmico foi escolhida, pois a adição de ácido fórmico proporcionou uma melhor recuperação dos analitos, o que já foi observado por outros autores.^{54,55} Além disso, o procedimento de extração juntamente com a etapa de congelamento proporcionou uma precipitação satisfatória dos interferentes, como proteínas, resultando em um extrato mais limpo e um procedimento mais simples do que o abordado por Faraji et al. (2016)⁵⁴, que utilizaram acetato de chumbo para o mesmo fim, este sendo tóxico podendo causar danos ao analista e maior dificuldade no tratamento dos resíduos provenientes da análise.

5.2 Espectrometria de Massas

Os fragmentos monitorados encontram-se na Tabela 4.

Tendo em vista que o medicamento veterinário halquinol é composto pela mistura do 5,7-dicloro-8-quinolinol, 5-cloro-8-quinolinol e 7-cloro-8-quinolinol, com porcentagens de 65,37%, 29,63% e 0,53%, respectivamente, considerando um teor total de 95,53% do material de referência, os dois compostos presentes em maior concentração foram monitorados no estudo.

Tabela 4: Fragmentos monitorados.

Analito	Íon precursor (m/z)	Fragmento Quantificação (m/z)	Fragmentos Confirmação (m/z)
Espectinomicina	351,1	333,1	207,1
5-Halquinol	180,1	145,0	116,9
5,7-Halquinol	214,0	150,0	179,0
Melamina	127,0	85,0	67,9
Zilpaterol	262,1	244,1	185,1

Os fragmentos escolhidos para os analitos melamina, zilpaterol e espectinomicina já haviam sido reportados na literatura por Chen *et al.*, (2015)³⁵, Li *et al.*, (2016)⁵⁵ e Hornish *et al.*, (1998)⁵⁶, garantindo confiabilidade.

Com os íons precursores e transições definidas, os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados com a finalidade de obter a máxima sensibilidade dos analitos (Tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros do espectrômetro de massas otimizados.

Analitos	DP(V)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)
Espectinomicina ¹	186	25	10	16
Espectinomicina ²	186	31	10	14
5-Halquinol ¹	41	33	10	6
5-Halquinol ²	41	39	10	14
5,7-Halquinol ¹	101	39	10	10
5,7-Halquinol ²	101	35	10	10
Melamina ¹	136	25	10	14
Melamina ²	136	37	10	28
Zilpaterol ¹	51	17	10	12
Zilpaterol ²	51	33	10	12
Temperatura da fonte	550 °C			
Pressão do gás	55 psi			

¹ fragmento de quantificação; ² fragmentos de confirmação.

5.3 Cromatografia líquida

Ambas as colunas testadas se mostraram eficientes para determinação dos medicamentos em estudo, no entanto, a coluna Venusil foi escolhida por apresentar maior resolução dos picos e menor comprimento e diâmetro, resultando em um menor tempo de análise e gastos menores de fase móvel.

O modo de eluição escolhido para melhor separação dos analitos foi por gradiente, o qual é uma mistura de solventes que varia ao longo da corrida cromatográfica (Tabela 6). As composições das fases móveis foram escolhidas de acordo com trabalhos já publicados para a determinação destes analitos separadamente utilizando pareador iônico, uma vez que esta é a primeira vez que um trabalho utiliza um único método para identificação e quantificação desses analitos em uma mesma corrida cromatográfica.^{11,12}

A melhor condição cromatográfica ficou estabelecida como a fase móvel A sendo composta por água e fase B acetonitrila, ambas contendo 0,12% de HFBA. Na tabela 7 são apresentadas as condições cromatográficas otimizadas e o tempo de retenção de cada analito.

Tabela 6: Gradiente de eluição.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
2	75	25
4	10	90
6	10	90
8	95	5
Equilíbrio 4	95	5

Tabela 7: Condições cromatográficas otimizadas e tempos de retenção dos analitos.

Analito	Tempo de retenção (min)
Espectinomicina	2,75
5-Halquinol	3,35
5,7-Halquinol	4,30
Melamina	1,55
Zilpaterol	2,74
<hr/>	
Volume de injeção	10 μL
Fluxo da fase móvel	200 $\mu\text{L min}^{-1}$
Temperatura do forno da coluna	40°C

Os tempos de retenção dos analitos utilizando a coluna cromatográfica escolhida foram de acordo com o esperado, de acordo com a polaridade dos mesmos. A eluição ocorreu em ordem decrescente de polaridade devido à composição da fase estacionária ser apolar e ao gradiente de eluição estipulado ter iniciado com composição aquosa. A figura 12 mostra o cromatograma obtido a partir das condições cromatográficas otimizadas.

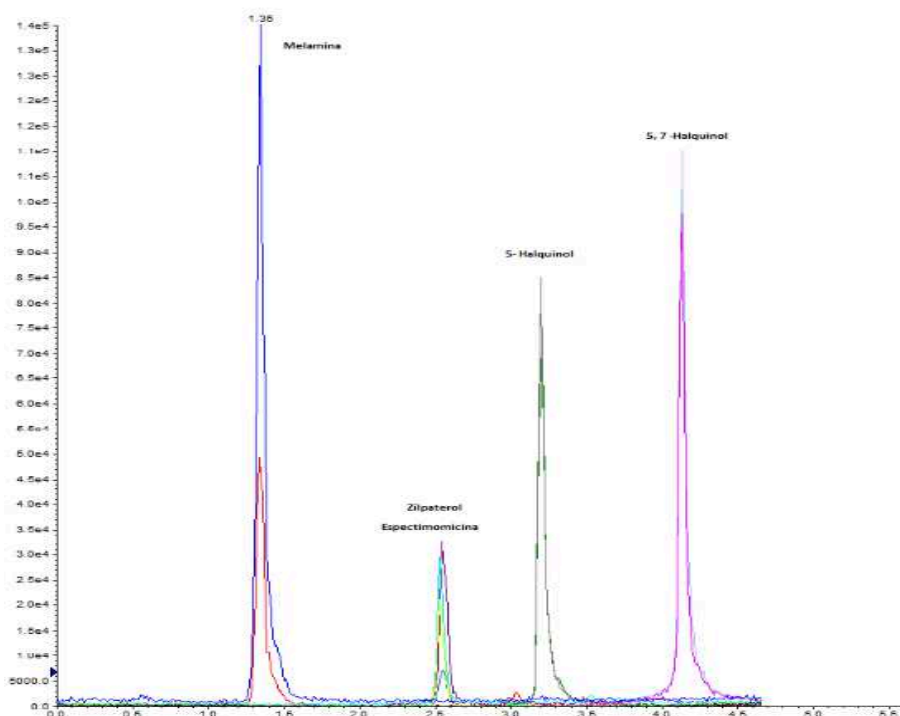


Figura 12. Cromatograma do terceiro ponto da curva de calibração obtido a partir das condições cromatográficas otimizadas.

5.4 Desempenho do método

A faixa de trabalho adotada para todos analitos durante os procedimentos de validação analítica foi de 0 a 5 mg kg⁻¹, tendo a curva de calibração com concentrações: 0; 0,625; 1,250; 2,500; 3,75 e 5 mg kg⁻¹, faixa de trabalho esta que deve ser semelhante a utilizada na rotina laboratorial, como sugerido pelo INMETRO, 2010.⁵⁷

5.4.1 Linearidade/Efeito de matriz

O método foi linear nas faixas de concentrações de 0 a 5 mg kg⁻¹ para todos os analitos, como pode ser observado na Figura 13. As curvas obtidas não mostraram diferença significativa quanto à inclinação e intercepto entre os dias estudados ($p > 0,05$) e os valores dos coeficientes de regressão foram satisfatórios ($R^2 > 0,95$). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos das curvas de calibração construídas em matriz.

	Equações 1,2 e 3	Coeficiente determinação (R^2)
Espectinomicina	Y=163204x-13721	0,9772
	Y=173440x+76989	0,9806
	Y=108833x+50022	0,9662
5-Halquinol	Y=276508x-4489	0,9820
	Y=310632x+40772	0,9883
	Y=195565x+63549	0,9845
5,7-Halquinol	Y=450035x-74043	0,9616
	Y=493609x+13088	0,9952
	Y=300248x+74591	0,9902
Melamina	Y=256188x-21644	0,9892
	Y=256983x+9021	0,9945
	Y=191737x+36293	0,9906
Zilpaterol	Y=568127x-55964	0,9702
	Y=661793x+59838	0,9938
	Y=392710x+149712	0,9770

A fim de realizar o estudo do efeito de matriz através da semelhança de matriz, curvas de calibração em solvente e matriz foram preparadas e analisadas (Figura 13).

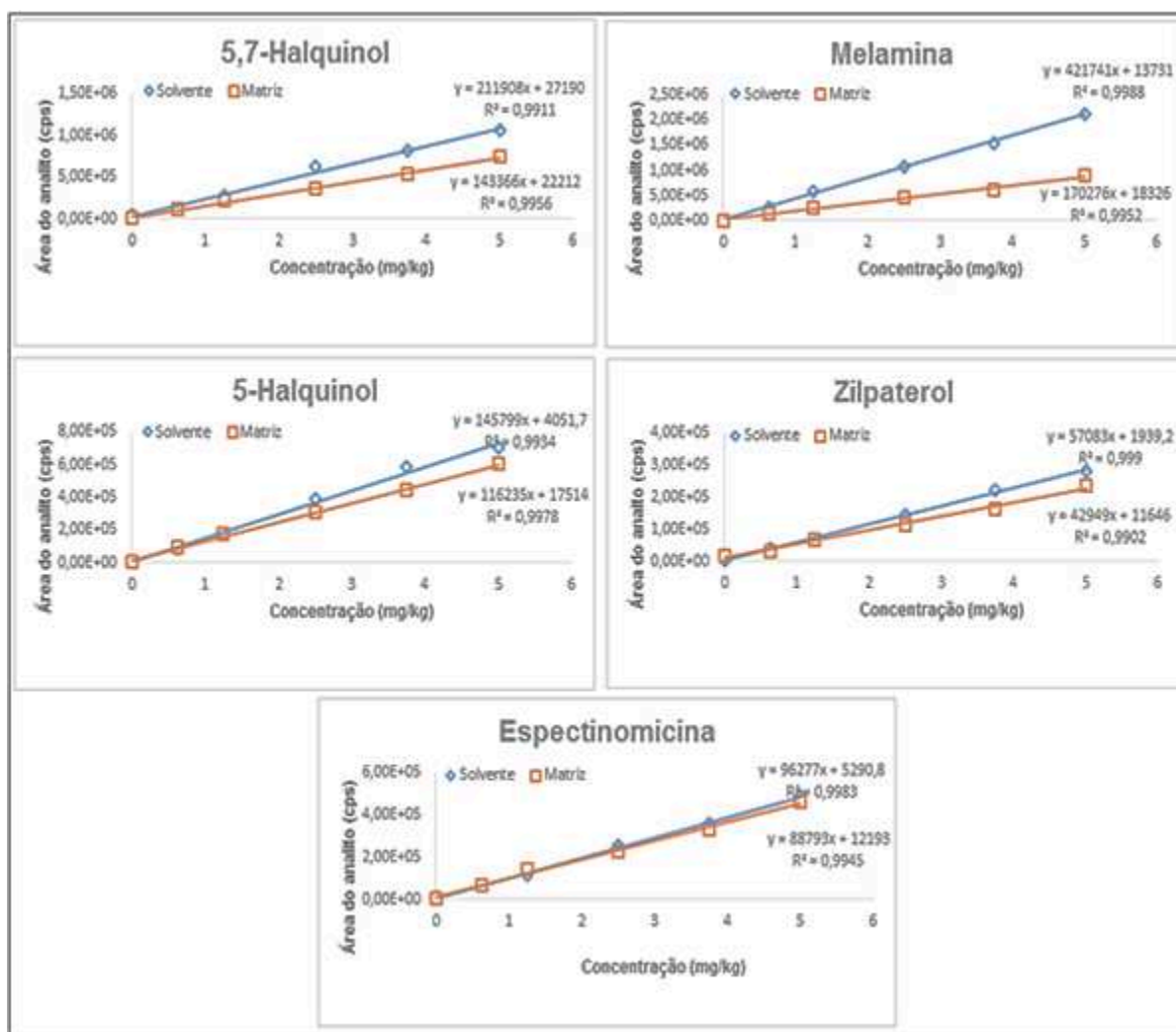


Figura 13: Curvas de calibração em solvente e matriz para cada analito.

O estudo das curvas de calibração em solvente e matriz mostrou supressão de sinal na resposta do analito quando a matriz simulada estava presente, com exceção da espectinomicina. Para estes analitos, foram observadas diferenças de inclinação significativas entre as curvas, encontrando-se valores de efeito de matriz inferiores a 0,9 (Tabela 9), de acordo com o cálculo proposto por Hoff *et al.* (2015).⁵³ Assim, foram adotadas curvas de calibração em matriz, para monitoramento dos analitos.

Tabela 9: Valores obtidos a partir do cálculo do efeito de matriz.

Analito	Inclinação matriz	Inclinação solvente	Matriz semelhante/Solvente
Espectinomicina	88793	96277	0,9
5-Halquinol	116235	145799	0,7
5,7-Halquinol	143366	211908	0,6
Melamina	170276	421741	0,4
Zilpaterol	42949	57083	0,7

5.4.2 Seletividade/ Especificidade

Não foram observadas interferências nos tempos de retenção dos analitos, o que mostra que o método não foi afetado por interferentes presentes na matriz. Porém, na análise da espectinomicina, foram observadas interferências com tempos de retenção próximos ao tempo de retenção do analito no primeiro ponto da curva de calibração (C0, ausência de padrão analítico). No entanto, à medida que padrão analítico é adicionado e sua concentração é aumentada na matriz, a intensidade do sinal do analito aumenta e as concentrações dos interferentes permanecem constantes. Podendo-se concluir que não há interferentes no mesmo tempo de retenção do analito e que as transições escolhidas foram satisfatórias, como pode ser observado na Figura 14.

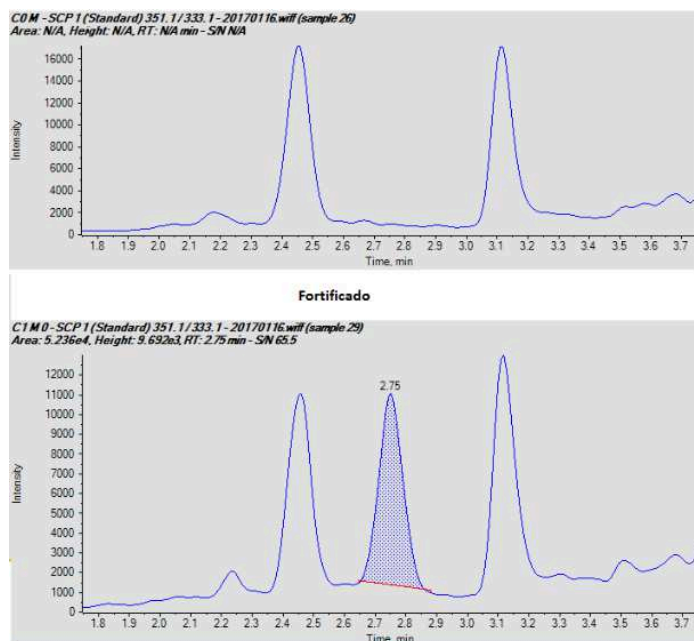


Figura 14: Cromatogramas do primeiro e segundo ponto da curva de calibração a partir da análise de espectinomicina.

O mesmo comportamento foi observado para as amostras fiscais analisadas.

5.4.3 Recuperação/exatidão

Os resultados de recuperação e precisão intermediária encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados de recuperação e precisão.

Analitos	Recuperação (%) e repetitividade			Precisão intermediária		
	(%CV)*			(%CV)		
	C2	C3	C4	C2	C3	C4
Espectinomicina	81(16,3)	80(8,9)	92(10,1)	21,7	10,1	11,2
5-Halquinol	85(14)	80(6,7)	87(9,1)	14,8	6,8	13,2
5,7-Halquinol	91(14)	83(8,4)	90(9,5)	14,5	10,4	11,1
Melamina	92(11,2)	87(7,9)	91(7,5)	11,2	8,7	8,7
Zilpaterol	87(13,4)	91(7,2)	88(8,0)	14,1	7,8	10,8

*Os valores entre parênteses são dados por coeficientes de variação (%CV).

As taxas de recuperação obtidas foram satisfatórias apresentando valores dentro da faixa aceita de 80 a 110%, demonstrando concordância entre os valores

obtidos e não havendo dispersão significativa nos ensaios realizados ($CV < 20\%$). Não houveram diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos analistas quando variados os dias de ensaio, resultando em um $CV < 30\%$ da precisão intermediária.

5.4.4 Limites analíticos

Segundo a decisão 2002/657/CE o resultado de uma análise deve ser considerado não conforme se o valor obtido for maior que o $CC\alpha$ do método de confirmação para substância analisada. Desta forma, o método deve apresentar valores de $CC\alpha$ bem próximos ao valor do limite regulatório da substância.⁵¹

Apesar de os analitos deste trabalho não apresentarem limites regulatórios, com exceção da melamina, o $CC\alpha$ foi determinado no quarto ponto da curva de calibração (C3) como forma de avaliar/observar os erros do método nesse nível de concentração, que seria o nível de interesse. Com relação aos limites de quantificação e detecção, o limite de quantificação ficou estabelecido como sendo o primeiro ponto da curva de calibração e o limite de detecção ficou estabelecido como $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os limites analíticos determinados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11: Limites analíticos.

Analitos	$CC\alpha$ (mg kg^{-1})	$CC\beta$ (mg kg^{-1})	LD (mg kg^{-1})	LQ (mg kg^{-1})
Espectinomicina	3,04	3,58		
5-Halquinol	3,04	3,58		
5,7-Halquinol	3,04	3,59	0,20	0,62
Melamina	2,92	3,34		
Zilpaterol	2,98	3,47		

Os valores de $CC\alpha$ ficaram entre 2,98 e $3,04 \text{ mg kg}^{-1}$, apresentando erros menores que 20%, valor considerado baixo considerando o nível de concentração avaliado de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Baixos limites de detecção e quantificação também foram obtidos, conferindo sensibilidade ao método. Vale ressaltar que estes limites poderiam ter sido mais baixos devido a sensibilidade da técnica, não sendo

necessário neste propósito, devido a um estudo prévio realizado sobre a quantidade adicionada destes medicamentos veterinários às rações animais.

5.4.5 Estabilidade

O estudo da estabilidade do extrato demonstrou que os analitos analisados mostraram-se estáveis nas condições armazenadas até o décimo dia, como mostra a Figura 15. Não havendo variações significativas de concentração neste período de tempo, uma vez que valores de p encontrados foram superiores a 0,05.

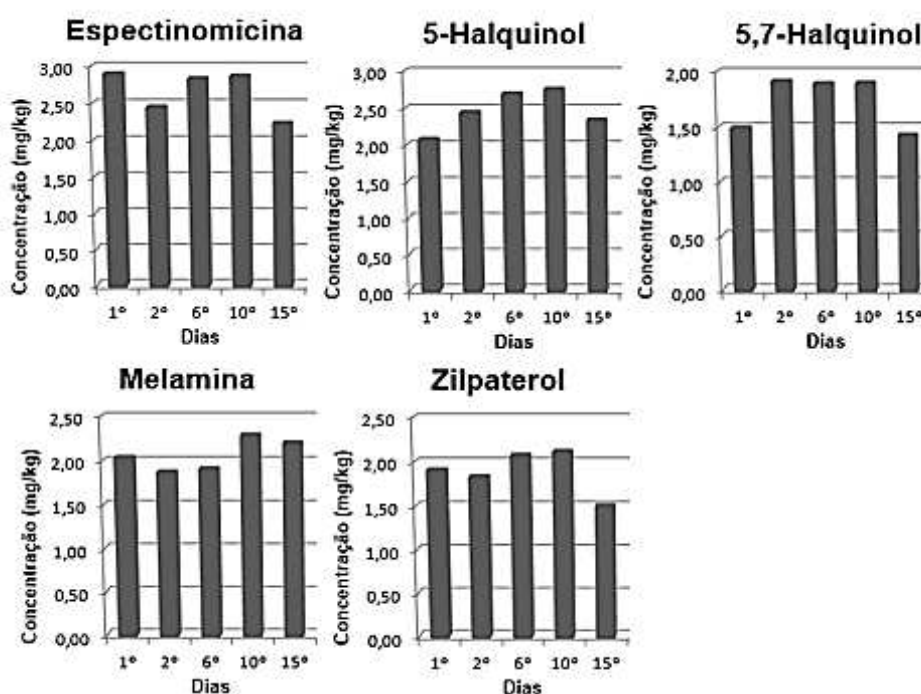


Figura 15: Representação gráfica do ensaio de estabilidade dos extratos.

5.5 Aplicabilidade do método

Os resultados obtidos a partir das análises encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados obtidos através das amostras analisadas.

Ração	Resultado (mg kg ⁻¹)/ Recuperação(%)				
	Espectinomicina	5-Halquinol	5,7-Halquinol	Melamina	Zilpaterol
N.1	<LOQ/136	<LOQ/150	<LOQ	<LOQ/156	<LOQ/169
N.2	<LOQ/80	<LOQ/76	<LOQ	<LOQ/102	<LOQ/84
N.3	<LOQ/96	<LOQ/95	<LOQ	<LOQ/114	0,646/104
N.4	<LOQ/70	<LOQ/81	<LOQ	<LOQ/82	<LOQ/79
N.5	<LOQ/101	19,93/71	8,767	<LOQ/116	<LOQ/112
N.6	<LOQ/107	<LOQ/96	<LOQ	<LOQ/100	1,13/130
N.7	<LOQ/87	<LOQ/83	<LOQ	<LOQ/90	<LOQ/89
N.8	<LOQ	3,22/102	4,571	<LOQ	<LOQ
N.9	<LOQ/92	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
N.10	<LOQ/99	<LOQ	<LOQ	<LOQ/198	<LOQ/85
N.11	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
N.12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
N.13	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
N.14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,228
N.15	<LOQ/136	<LOQ/173	<LOQ	<LOQ/143	<LOQ/170
N.16	<LOQ/101	<LOQ/153	<LOQ	<LOQ/119	<LOQ/132
N.17	<LOQ/104	<LOQ/257	<LOQ	<LOQ/160	<LOQ/164
N.18	<LOQ/98	<LOQ/174	<LOQ	<LOQ/122	<LOQ/126
N.19	<LOQ/81	<LOQ/123	<LOQ	<LOQ/94	<LOQ/96
N.20	<LOQ/ 73	<LOQ/91	<LOQ	<LOQ/87	<LOQ/112

Observou-se a presença dos medicamentos veterinários analisados nas rações 3, 5, 6, 8 e 14, o que reforça a relevância do desenvolvimento do método analítico em estudo. É importante destacar a necessidade de diluição da amostra 5 para se obter um valor confiável, tendo em vista que a concentração obtida de halquinol excedeu a concentração limite da curva de calibração (5 mg kg⁻¹).

A partir do estudo das recuperações pôde-se concluir que a matriz branca utilizada para a calibração não reproduz todas as matrizes das amostras analisadas, ou seja, a matriz não teve semelhança com as matrizes das amostras reais, principalmente para rações com composições inorgânicas, tornando necessário, outro método de calibração ou a realização de um novo estudo utilizando outra matriz branca. Também não se obteve recuperação do analito 5,7-halquinol em

nenhuma matriz, porém a determinação de halquinol nas amostras foi possível devido a quantificação do 5-halquinol, que obteve recuperação em algumas matrizes, ressaltando a importância de tê-lo incorporado na validação. A diferença entre as recuperações pode ser relacionada com as diferentes interações dos analitos com a matriz, tornando necessário a realização de um estudo a respeito.

5.6 Cromatografia por interação hidrofílica (HILIC)

A separação por interação hidrofílica, assim como por par iônico, é uma alternativa de separação para compostos que não ficam retidos em fase estacionária reversa. O princípio da HILIC é baseado na partição dos analitos entre as fases móvel (alta concentração orgânica) e a camada de solvatação formada em torno da fase estacionária. Essa fase estacionária pode ser simplesmente sílica ou ter grupos químicos ligados a ela, possibilitando a presença de outros tipos de interações.^{42,43}

Os parâmetros do espectrômetro de massas utilizados foram os mesmos otimizados para a separação utilizando pareador iônico (Tabela 5).

Foram testados diversos gradientes com base no estudo proposto por Chen *et al.*, (2015)³⁵, onde a fase móvel A é aquosa e a B composta por ACN, ambas com a adição de formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ e ácido fórmico 0,1%. O gradiente de eluição e parâmetros cromatográficos otimizados que obtiveram maior sensibilidade dos analitos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13: Parâmetros cromatográficos.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
1	5	95
3	5	95
5	50	50
7	70	30
Equilíbrio 10	95	5
Volume de injeção	10 µL	
Fluxo da fase móvel	350 µL	
Temperatura da coluna	40 °C	

O cromatograma obtido a partir das condições otimizadas encontra-se na Figura 15 e os tempos de retenção dos analitos na Tabela 14.

Tabela 14: Tempos de retenção dos analitos em estudo.

Analito	Tempo de retenção (min)
Espectinomicina	6,70
5-Halquinol	1,12
5,7-Halquinol	1,40
Melamina	2,40
Zilpaterol	1,80

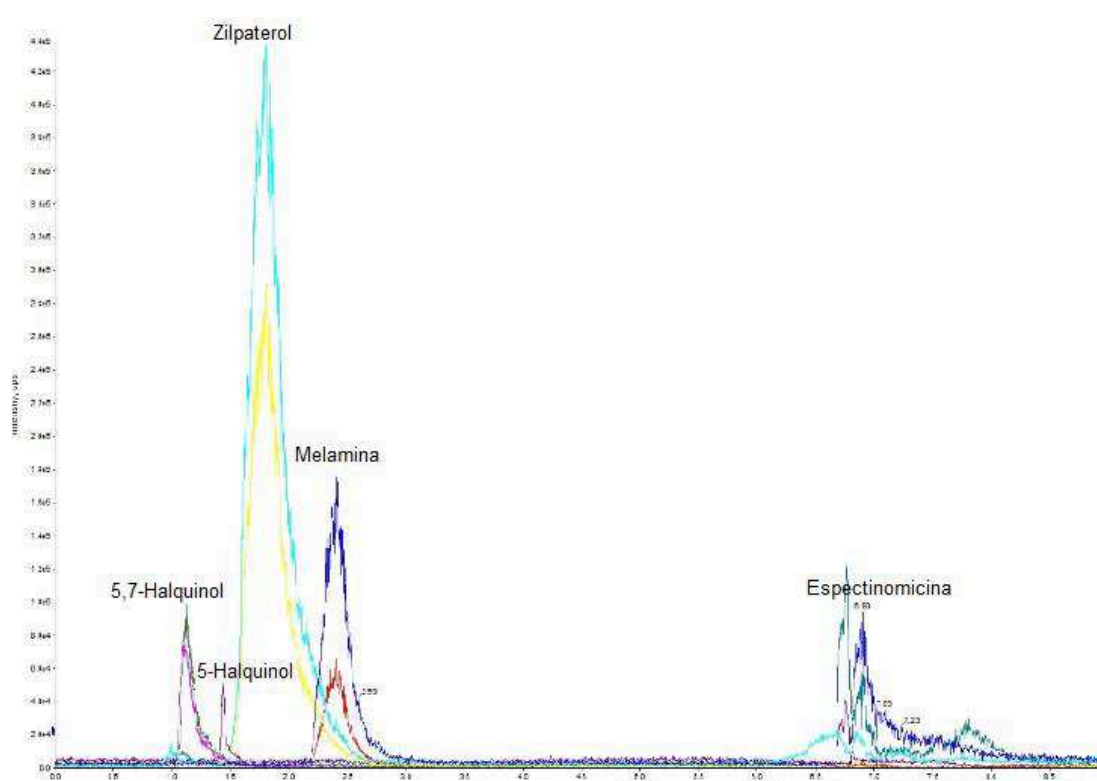


Figura 15: Cromatograma obtido a partir das condições cromatográficas otimizadas para a coluna HILIC (terceiro ponto da curva de calibração).

A partir do cromatograma obtido pode-se observar que a coluna HILIC não promoveu uma separação adequada dos analitos, além de apresentar baixa resolução. Como observado também por Salgueiro, (2015)⁵⁸, em seu trabalho, esta técnica mostrou-se ser pouco robusta, tendo a necessidade de se ter condicionamento extenso e cuidadoso, demandando um maior tempo de análise e consequentemente maior gasto de fases móveis e volume de resíduos gerados,

além da necessidade da presença de tampão, uma vez que a técnica é extremamente sensível a variações de pH.

5.7 Comparação cromatografia por par iônico e interação hidrofílica

As comparações entre as técnicas cromatográficas de separação serão baseadas em quatro critérios básicos que devem ser levados em conta no desenvolvimento de um novo método analítico: eficiência de separação, tempo de análise, custo e quantidade de resíduos gerados.

A partir dos cromatogramas obtidos através das duas técnicas analisadas para separação dos analitos abordados no presente estudo observou-se, tendo em vista as colunas e condições cromatográficas utilizadas, melhor desempenho da técnica de separação por par iônico utilizando fase estacionária reversa, como pode ser observado pela Figura 16, que ilustra os dois cromatogramas obtidos pelas diferentes técnicas.

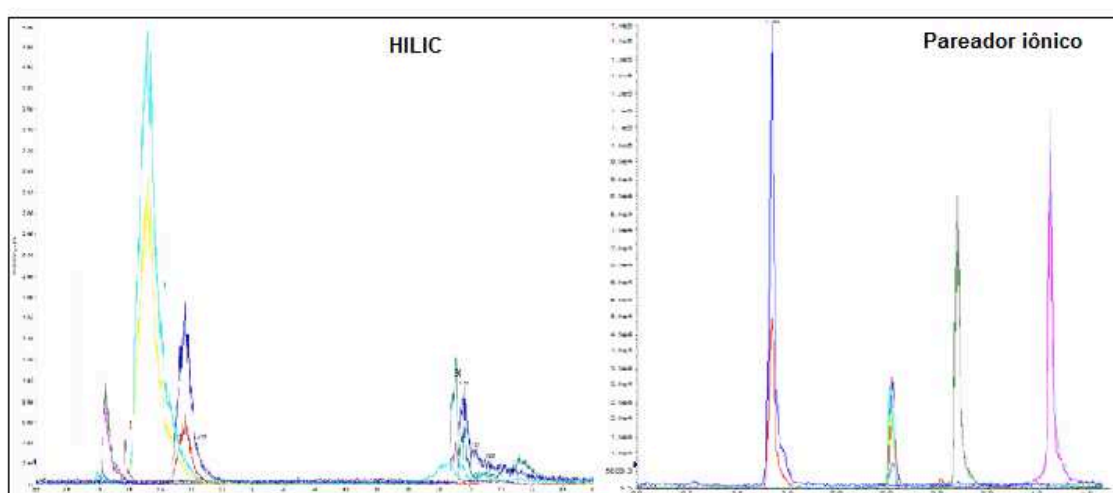


Figura 16: Comparação dos cromatogramas obtidos no terceiro ponto da curva de calibração.

A separação utilizando pareador iônico proporcionou maior sensibilidade dos analitos, melhor separação e picos mais eficientes e bem definidos, consequentemente mostrou-se mais eficiente na separação dos analitos em questão.

Além de proporcionar uma separação dos analitos mais eficiente, a cromatografia por par iônico a fez em um menor período de tempo (par iônico: 12 minutos e HILIC: 17 minutos), implicando em um consumo menor de fase móvel (3,55 mL a menos que no modo HILIC) e, conseqüentemente, em um menor volume de resíduos gerados, tornando-a mais adequada, principalmente para laboratórios que dispõem de alta frequência analítica.

A técnica de separação por pareador iônico também se mostrou mais econômica, levando em conta o custo das colunas e que colunas C₁₈ são simples e amplamente encontradas tanto em laboratórios de pesquisa quanto prestação de serviços, devido a sua alta versatilidade. Quanto ao pareador iônico, observou-se a partir do método desenvolvido e validado, sua eficiência mesmo em baixas concentrações, não sendo necessária grandes quantidades de pareador para promover uma separação adequada e eficiente.

Portanto, a técnica de separação por pareador iônico foi mais adequada, levando em conta os quatro critérios avaliados.

6. CONCLUSÃO

O método desenvolvido mostrou-se adequado e rápido para separação e quantificação dos analitos em estudo, mas, para proporcionar confiabilidade analítica, alguns parâmetros de validação devem ser revisados, uma vez que a matriz utilizada no procedimento de calibração não foi representativa para análise de algumas amostras reais, tornando necessário a utilização de uma nova matriz ou um outro procedimento de calibração, para assim o método ser validado e utilizado na rotina laboratorial. A presença dos analitos halquinol e zilpaterol nas amostras analisadas, que obtiveram recuperações adequadas, reforça a importância do monitoramento desses medicamentos, tendo em vista a proteção dos animais e consumidores.

A técnica de separação utilizada no desenvolvimento do método também se mostrou mais adequada quando comparada com a técnica envolvendo separação por interação hidrofílica, levando em conta eficiência de separação, tempo de análise, custo e geração de resíduos, o que justifica sua utilização no desenvolvimento deste método. Dessa forma, o método proposto precisa ser adaptado para ser um meio eficiente na fiscalização destes medicamentos veterinários em alimentos para animais.

7. REFERÊNCIAS

¹A. Boscher, C. Guignard, T. Pellet, L. Hoffmann, T. Bohn, Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feeding stuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6394–6404.

²Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. Animal Production and Health. FAO Supports Measures to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance 2015; URL http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/news_archive/2011_04_AMR.html. (Accessed 7 April 2017)

³A.R. Nisha, Antibiotic residues-a global health hazard, *Vet. World* 1 (2008) 375–377.

⁴European Union, Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, *Off. J. Eur. Union L* 268 (2003) 29–43.

⁵VALESE, Andressa Camargo et al. Development, validation and different approaches for the measurement uncertainty of a multi-class veterinary drugs residues LC–MS method for feeds. *Journal Of Chromatography B*, [s.l.], v. 1053, p.48-59, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.026>.

⁶Zeleny, R.; Ulberth, F.; Gowik, P.; Polzer, J.; Ginkel, L. A. Emons H. Developing new reference materials for effective veterinary drug-residue testing in food-producing animals. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, 25 (2006) 927-936.

⁷Hughes, P., & Heritage, J. (2004). Antibiotic growth-promoters in food animals. In *Assessing quality and safety of animal feeds*. FAO, Rome, Italy. (pp. 129-151).

⁸Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., & Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), 28-52.

⁹Ronquillo M.G. & Angeles Hernandez J.C., Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods, *Food Control* (2016)

¹⁰WANG, Yuan *et al.* Study of matrix effects for liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 4 aminoglycosides residues in milk. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1437, p.8-14, mar. 2016.

¹¹FAROUK, Faten; AZZAZY, Hassan M.e.; NIESSEN, Wilfried M.a.. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 890, p.21-43, ago. 2015

¹²Carson MC, Heller DN. 1998. Confirmation of spectinomycin in milk using ion-pair solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry. *J Chromatograph B Biomed Sci Appl.* 718:95–102

¹³TYPULKOWSKA, K. *et al.* Development of high performance liquid chromatography methods with charged aerosol detection for the determination of lincomycin, spectinomycin and its impurities in pharmaceutical products. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 112, p.8-14, ago. 2015.

¹⁴KAHSAY, Getu *et al.* Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 87, p.142-154, jan. 2014

¹⁵CARDOSO, Maria Antoanete Brandalize. **A UTILIZAÇÃO DA DROGA HALQUINOL® COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO E COADJUVANTE NO CONTROLE DA COCCIDIOSE**. 2000. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

¹⁶Pavithra BH, Jayakumar K, Bhat A, Mohan K, Prakash N, Shuaib AH. Determination of 5,7-dichloroquinolin-8-ol and 5-chloroquinolin-8-ol in bulk drug powder and pharmaceutical preparation by TLC. *Chron Young Sci* 2011;2:47-9.

¹⁷MUSHIGERI, Sadanand *et al.* A VALIDATED METHOD FOR HALQUINOL EXTRACTION FROM CHICKEN LIVER MATRIX FOR RESIDUAL HPLC STUDIES: Halquinol Extraction from Chicken Liver. **Journal Of Basic & Clinical Physiology & Pharmacology: Halquinol Extraction from Chicken Liver**. Karnataka, 04 jul. 2016. Short Communication, Seção 17, p. 133-141.

¹⁸Analytical Methods Committee. *Analyst, January, 1981, Vol. 106,pp 105-113*

¹⁹ESTRADA-ANGULO, A. *et al.* Influence of level of zilpaterol chlorhydrate supplementation on growth performance and carcass characteristics of feedlot lambs. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 80, n. 1-3, p.107-110, nov. 2008. Elsevier BV.

²⁰MACÍAS-CRUZ, U.; ÁLVAREZ-VALENZUELA, F.D.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, J. *et al.* Crecimiento y características de canal en corderos Pelibuey puros y cruzados F1 con razas Dorper y Katahdin en confinamiento. *Arch. Med. Vet.*, v.42, p.147- 154, 2010.

²¹AVENDANO-REYES, L. *et al.* Effects of zilpaterol hydrochloride on growth performance, carcass characteristics, and wholesale cut yield of hair-breed ewe lambs consuming feedlot diets under moderate environmental conditions. **Journal Of Animal Science**, [s.l.], v. 89, n. 12, p.4188-4194, 15 jul. 2011. American Society of Animal Science (ASAS).

²²López-Carlos, M. A., J. I. Aguilera-Soto, R. G. Ramírez, H. Rodríguez, O. Carrillo-Muro, and F. Méndez-Llorente. 2014. Effect of zilpaterol hydrochloride on growth performance and carcass characteristics of wether goats. *Small Rumin. Res.* 117:142–150. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.12.035

²³Hales, K. E., S. D. Shackelford, J. E. Wells, D. A. King, M. D. Hayes, T. M. Brown-Brandl, L. A. Kuehn, H. C. Freely, and T. L. Wheeler. 2014. Effects of feeding dry-rolled corn-based diets with and without wet distillers grains with solubles and zilpaterol hydrochloride on performance, carcass characteristics and heat stress in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 92:4023– 4033. doi:10.2527/jas.2014-7638.

²⁴Boyd, B. M., Shackelford, S. D., Hales, K. E., Brown-Brandl, T. M., Bremer, M. L., Spangler, M.L., Erickson, G. E. (2015). Effects of shade and feeding zilpaterol hydrochloride to finishing steers on performance, carcass quality, heat stress, mobility, and body temperature. *Journal of Animal Science*, 93, 5801–5811.

²⁵Sumano, L. H., C. L. Ocampo, and O. L. Gutierrez. 2002. Clenbuterol and other β -agonist, are they an option for meat production or a threat for public health? *Vet. Mex.* 33:137.–159.

²⁶Shelver, W. L., and D. J. Smith. 2006. Tissue residues and urinary excretion of zilpaterol in sheep treated for 10-days with dietary zilpaterol. *J. Agric. Food Chem.* 54:4155.–4161.

²⁷Bocca, B., Di Mattia, M., Cartoni, C., Fiori, M., Felli, M., Neri, B. & Brambilla, G. (2003) Extraction, clean-up and gas chromatography-mass spectrometry characterization of zilpaterol as feed additive in fattening cattle. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 783, 141–149.

²⁸BLANCA, José *et al.* Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 529, n. 1-2, p.199-205, jan. 2005. Elsevier BV.

²⁹LIN, Yen-ping *et al.* Determination of multiresidue analysis of β -agonists in muscle and viscera using liquid chromatograph/tandem mass spectrometry with Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe methodologies. **Journal Of Food And Drug Analysis**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.275-284, abr. 2017.

³⁰Watson D (ed.) *Food Chemical Safety*, vol. 2 – Additives. Cambridge: Woodhead Publishing.

³¹JIANG, Xiaoqing *et al.* Design and synthesis of a novel lanthanide fluorescent probe (EuIII-dtpa-(bis)melamine) and application in melamine detection in milk products. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 238, p.605-612, jan. 2017.

³²MAUER, L. J. *et al.* Melamine detection in infant formula powder using near-and mid-infrared spectroscopy. **Journal Agricultural Food Chemical**, Washington, vol. 57, n. 10, p. 3974-3980, 2009.

³³Food and Agriculture Organization (FAO), 2010. International experts limit Melamine levels in food.

³⁴European Commission. 2009. Commission Regulation 1135/2009/EC of 25 November 2009 imposing special conditions governing the import of certain products originating in or consigned from China, and repealing Commission Decision 2008/798/EC.

³⁵CHEN, Dawei *et al.* A novel dispersive micro solid phase extraction using PCX as the sorbent for the determination of melamine and cyromazine in milk and milk powder by UHPLC-HRMS/MS. **Talanta**, [s.l.], v. 134, p.144-152, mar. 2015.

³⁶TKACHENKO, Andriy *et al.* Investigation of melamine and cyanuric acid deposition in pig tissues using LC-MS/MS methods. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 80, p.310-318, jun. 2015.

³⁷SU, Xuan *et al.* Modified SBA-15 matrices for high-throughput screening of melamine in milk samples by MALDI-TOF MS. **International Journal Of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 338, p.39-44, mar. 2013.

³⁸COLLINS, H. Carol; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, S: Editora Unicamp, 2006.

³⁹LANÇAS, Fernando Mauro *et al.* A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

⁴⁰HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. Sexta edição. Porto Alegre: Bookman, 2009.

⁴¹PETRITS, K.; CHAIMBAULT, P.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography and ionspray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 896, n. 1-2, p.253-263, 2000.

⁴²BUSZEWSKI, Bogusław; NOGA, Sylwia. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231-247, 2012.

⁴³LANÇAS, Fernando M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2010.

⁴⁴KAKLAMANOS, G.; APREA, E.; THEODORIDIS, G.. Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation. **Encyclopedia Of Food And Health**, [s.l.], p.661-668, 2016.

⁴⁵Boris L. Milman, General principles of identification by mass spectrometry, **Trends in Analytical Chemistry** (2015).

⁴⁶PAVIA, Donald L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**, tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

⁴⁷DEWALD, Howard D. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications (ed. Cole, Richard B.). **Journal of Chemical Education**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.33-33, 1999. American Chemical Society (ACS).

⁴⁸IGLESIAS, A. H. **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida Espectrometria de Massas**. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met//minicursos>>. Acesso em: maio de 2017.

⁴⁹ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração. Brasília. ISO/IEC 17025, 2005.

⁵⁰RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima; FERREIRA*, Márcia Miguel Castro. PLANILHA DE VALIDAÇÃO: UMA NOVA FERRAMENTA PARA ESTIMAR FIGURAS DE MÉRITO NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS UNIVARIADOS. **Química Nova**, Campinas, v. 31, p.164-171, 2008.

⁵¹E.C. European Commission. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. **Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results**. Off. J. of the Eur. Communities, Brussels, L221/8, 2002.

⁵²BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília. MAPA/ACS, 2011.

⁵³HOFF, R.B., *et al.* Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443-450, 2015.

⁵⁴FARAJI, M.; ADELI, M.. Sensitive determination of melamine in milk and powdered infant formula samples by high-performance liquid chromatography using dabsyl chloride derivatization followed by dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 221, p.139-146, abr. 2017.

⁵⁵LI, Tingting *et al.* Broad screening and identification of β -agonists in feed and animal body fluid and tissues using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry combined with spectra library search. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 192, p.188-196, fev. 2016

⁵⁶HORNISH, R. WIEST, J. R. Quantitation of spectinomycin residues in bovine tissues by ion-exchange high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and confirmation by reversed-phase high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 812, n. 1-2, p.123-133, jul. 1998.

⁵⁷INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 3. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 20p.

⁵⁸SALGUEIRO, Jéssica Silva. **Nova estratégia bioanalítica baseada em cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem para a quantificação de aminoácidos em matrizes biológicas**. 2015. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.